

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Vít Dohnálek

Struktura a funkce invazního aparátu mikrosporidií
Structure and function of the invasion apparatus of microsporidia

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24. 4. 2018

Vít Dohnálek

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Pavlu Doležalovi, Ph.D. za velkou pomoc při psaní této práce a prof. doc. RNDr. Jiřímu Vávrovi, DrSc. za poskytnutí literatury.

Abstrakt

Mikrosporidie jsou obligátní intracelulární parazité, kteří jsou významní z medicínského a hospodářského hlediska. Vyvinul se u nich vysoce specializovaný invazní aparát, který nemá u žádných jiných organismů obdoby. Při invazi dochází k uvolnění sporoplasmy z obalu spory a jejímu přenosu polární trubicí do cytoplasmy hostitelské buňky. Současný výzkum tohoto aparátu je zaměřen především na polární trubicí, která je jeho nejviditelnější strukturou. Funkčně neméně významný polaroplast a posteriorní vakuola zůstávají mimo hlavní zájem výzkumu, přestože hrají klíčovou roli v aktivaci a exekuci invaze. Při optimální kombinaci vnějších faktorů dochází ke změnám v organizaci polaroplastu, zvětšování objemu posteriorní vakuoly a vystřelení polární trubice. Sporoplasma je následně vytlačena rostoucí posteriorní vakuolou skrze trubicí do hostitelské buňky. Mechanismus tohoto procesu zatím není objasněn, ale existuje řada teorií snažících se průběh germinace vysvětlit. V této práci jsou shrnuty dosavadní poznatky a teorie o struktuře a funkci jednotlivých částí invazního aparátu.

Klíčová slova: Mikrosporidie, invaze, polární trubice, intracelulární parazitismus, germinace

Abstract

Microsporidia are obligate intracellular parasites that cause significant economic damage and can infect humans. They have evolved highly specialized invasion apparatus that is unique to them. During the invasion the sporoplasm is released from the spore wall and it is transferred to the host cytoplasm through the polar tube. Current research on the invasion apparatus has been focused mainly on the polar tube that is its most prominent structure. Polaroplast and posterior vacuole remain out of the main interest, although they are necessary for the activation and execution of the invasion. If the right combination of environmental factors occurs, the organization of the polaroplast begins to change, the posterior vacuole starts to swell and the polar tube is discharged. Sporoplasm is eventually pushed through the tube into the host cell by growing posterior vacuole. The mechanism has not been explained yet however plenty of theories are trying to explain the germination. This work summarizes current theories and knowledge of structure and function of particular parts of the invasion apparatus.

Key words: Microsporidia, invasion, polar tube, intracellular parasitism, germination

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Stavba a složení polární trubice.....	4
3 Biogeneze polární trubice.....	9
4 Stěna spory.....	10
5 Polaroplast.....	12
6 Faktory ovlivňující germinaci.....	14
7 Germinace.....	15
8 Invaze do hostitelské buňky.....	18
9 Evoluce polární trubice.....	19
10 Závěr.....	21
11 Použitá literatura.....	22

1 Úvod

Mikrosporidie jsou eukaryotičtí obligátní intracelulární jednobuněční parazité, kteří napadají široké spektrum hostitelů a způsobují nemoci s různými projevy. Prvním popsáním druhem byla *Nosema bombycis*, objevená v roce 1870 Louisem Pasteurem (Han & Weiss, 2017). Tato mikrosporidie způsobuje u *Bombyx mori* nemoc pébrine, která zapříčiňuje úhyn jedinců již v larválním stadiu (Patil & Geetha Bai, 1989). Mikrosporidie také velmi často napadají ryby a zejména v chovech se snadno šíří a páchají hospodářské škody (Hauck, 1984; Kent, 2014). U lidí se vyskytují nejčastěji rody *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* jako oportunní parazité, a to především u HIV pozitivních, u nichž zapříčiňují průjemové onemocnění (Curry & Canning, 1993; Dobbins & Weinstein, 1985).

Dnes již známe mikrosporidií přes tisíc druhů a řadíme je do více než dvou set řádů. Najdeme mezi nimi velkou variabilitu jak na buněčné úrovni, tak na úrovni životního cyklu. Obecně však můžeme životní cyklus shrnout do tří základních fází (Obr. 1), a to infekční, proliferativní a sporogonické (Cali & Takvorian, 2014).

Infekční fáze začíná uvolněním spory z hostitelské buňky. Spora následně čeká v extracelulárním prostředí pro potřebné stimuly, které vedou k aktivaci invazního aparátu a infekci hostitelské buňky. Jakmile se mikrosporidie dostává do hostitelské buňky, nastává fáze proliferativní (též merogonie), při níž se mikrosporidie množí. Sporogonickou fází označujeme část životního cyklu, kdy se začne tvořit okolo cytoplazmatické membrány mikrosporidie pevná stěna. Proliferativní a sporogonická fáze se odehrává buď v cytoplasmě hostitelské buňky (Palenzuela et al., 2014) nebo v nukleoplasmě (Freeman & Sommerville, 2009), případně u rodu *Encephalitozoon* v parazitoformní vakuole (Bohne, Böttcher, & Groß, 2011).

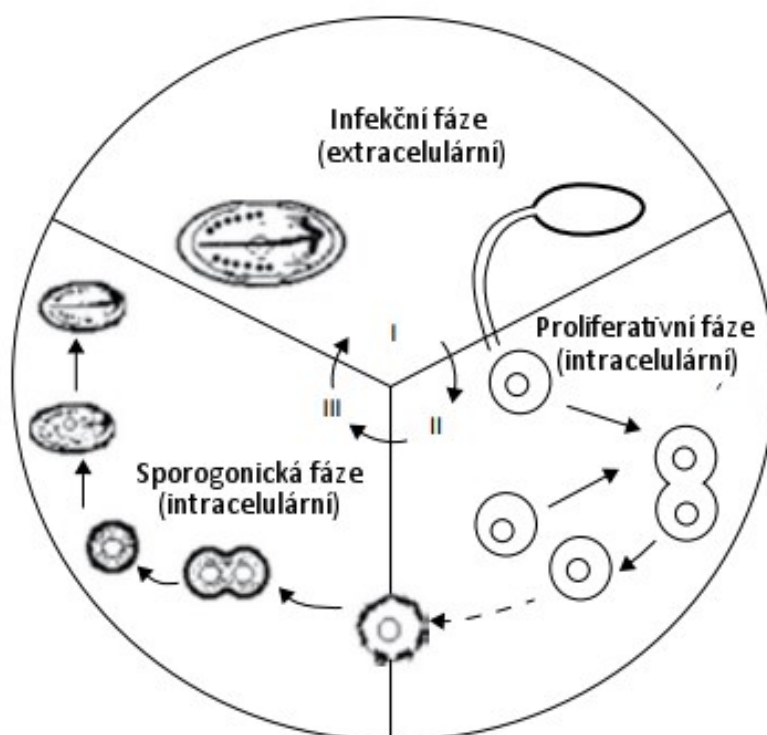
Sexuální rozmnožování dosud nebylo u mikrosporidií prokázáno, ale na základě genetických analýz a ultrastrukturních pozorování se předpokládá, že probíhá podobně jako u hub ve třech základních krocích: Rozpoznání partnera a splynutí buněk, splynutí jader a zvýšení ploidie a nakonec meióza (Lee & Heitman, 2014).

Buňka mikrosporidie je v mnoha aspektech odlišná od „klasické“ eukaryotické buňky živočichů (Obr. 2). Namísto mitochondrií mají pouze jejich pozůstatky mitosomy (Williams, Hirt, Lucocq, & Embley, 2002), které zcela postrádají mitochondriální DNA a jedinou zatím známou funkci je tvorba Fe-S klastrů (Goldberg et al., 2008). Jejich ribozomální RNA je velikostí blíže prokaryotické rRNA (Curgy, Vavra, & Vivares, 1980; Vossbrinck et al., 1987),

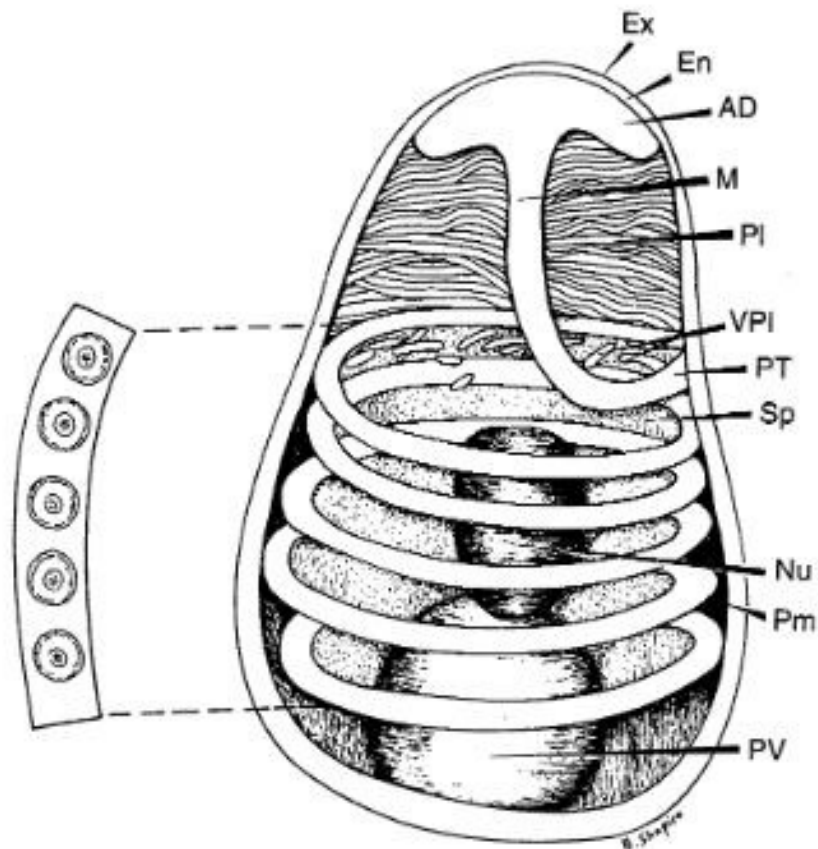
postrádají peroxisomy (Vávra & Lukeš, 2013) a jejich Golgiho aparát je nestandardní svou stavbou a absencí COP váčků (Beznoussenko et al., 2007).

Během sporogonie, kdy se buňky transformují do podoby odolné a infekční spory, dochází k *de novo* vývoji invazního aparátu zabírajícího značnou část buňky. Doposud byl při studiu fungování invazního aparátu kladen hlavní důraz na charakterizaci polární trubice, která představuje dominantní strukturu aparátu. Pro vlastní proces invaze je však stejně nezbytná i posteriorní vakuola a polaroplast, o jejichž funkci víme velmi málo (viz. Kapitoly Germinace, Polaroplast).

Přestože jsou mikrosporidie významné z hospodářského a medicínského hlediska, mechanismus, jímž infikují hostitele, není přesně znám. Cílem této práce je shrnutí současných poznatků o struktuře a mechanismu invazního aparátu mikrosporidií a uvedení teorií o průniku parazita do hostitelské buňky.



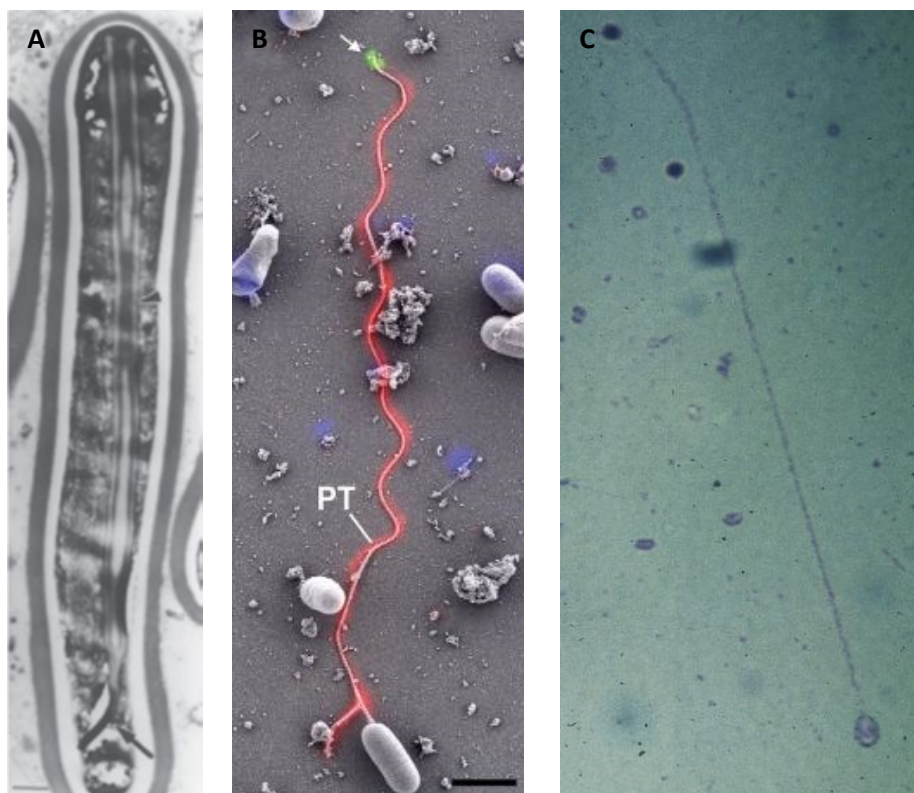
Obr. 1. Diagram typického životního cyklu mikrosporidie (upraveno podle Cali & Takvorian, 2014)



Obr. 2. Diagram spory mikrosporidie (Weiss, 2001); **Ex** – exospora, **En** – endospora, **AD** – kotvící disk, **M** – anteriorní část polární trubice, **PI** – lamelární polaroplast, **VPI** – vezikulární polaroplast, **PT** – posteriorní část polární trubice, **Sp** – sporoplasma, **Nu** – jádro, **Pm** – plasmatická membrána, **PV** – posteriorní vakuola

2 Stavba a složení polární trubice

Topologicky můžeme polární trubici rozdělit na dva úseky, posteriorní a anteriorní. Posteriorní je smotán do obrátek kolem sporoplasmy a u většiny známých druhů značně přesahuje délku samotné spory. Vlastní počet obrátek závisí na druhu, respektive délce polární trubice. Například u *Nosema algerae* měří spory na délku maximálně 10 μm , zatímco jejich vlákno dosahuje délky 75 – 100 μm (Frixione et al., 1992). Na opačném pólu spektra se nachází *Mrazekia tetraspora*, jejíž polární trubice dosahuje délky pouze kolem dvou pětín délky spory, tudíž netvoří žádné obrátky (Bylén & Larsson, 1996). U *Nosema locustae* můžeme napočítat 18 zavinutí (Huger A., 1960). Délka trubice je tedy napříč druhy velmi variabilní (Obr. 3). V obecnějších charakteristikách mikrosporidií se ale často setkáme se zaokrouhlenou hodnotou 30 obrátek (Keohane & Weiss, 1998; Xu & Weiss, 2005). Kratší anteriorní část je rovná a napojena na kotevní disk, pomocí něhož je uchycena ve stěně spory (Bohne, Böttcher, & Groß, 2011).



Obr. 3. Variabilita délky polární trubice (Franzen & Ller, 1999; Han et al., 2017; Vávra & Larsson, 2014); **A** - *Bacillidium strictum*, **B** – *Encephalitozoon hellem*, **PT** – polární trubice, šipka ukazuje uvolněnou sporoplasmu, **C** – *N. algerae*

Polární trubice je složena z proteinů, které označujeme PTP, tedy polar tube protein (Weidner, 1976). Dnes známe pět těchto proteinů, které však byly doposud specificky identifikovány jen u některých druhů mikrosporidií (Han & Weiss, 2017). Zda jiné druhy mikrosporidií staví svou polární trubici ze zcela jiných proteinů či velmi sekvenčně divergovaných homologů PTP je předmětem budoucího výzkumu.

Z *Encephalitozoon hellem* byl poprvé izolován protein, který byl pomocí značení protilátkami lokalizován v polární trubici (Keohane et al., 1998). Tento protein, nazvaný PTP1, je majoritní složkou polární trubice tvořící zhruba 70% jejího proteinového složení (Xu, Takvorian, Cali, Orr, & Weiss, 2004a). PTP1 se nepochybně liší od známých proteinů ani neobsahuje žádné známé domény. Je tvořen cca 400 aminokyselinami, nejvíce prolinem, glycinem a serinem (Keohane et al., 1998). Cysteinové zbytky a s nimi spojená tvorba disulfidických můstků jsou pravděpodobně klíčovým faktorem pro stavbu polární trubice (Han & Weiss, 2017). Tomu by odpovídal i fakt, že obsah a umístění cysteinů v sekvenci je konzervované napříč druhy. Sekvence PTP1 napříč druhy jsou však značně rozdílné; společnými znaky jsou vysoký obsah prolinu a podobný obsah cysteinu. Usuzuje se proto, že funkce proteinu je zachována skrze konzervovanost sekundárních strukturních motivů (Weiss, 2001). Vysoký obsah prolinu zřejmě propůjčuje tomuto proteinu značnou elasticitu potřebnou pro vlastní vystřelení polární trubice (Xu & Weiss, 2005).

PTP1 je posttranslačně modifikován. V jeho sekvenci nalezneme místa umožňující N- i O-glykosylaci (Delbac, Peuvrel, Metenier, & Vivares, 2001), experimentálně byla ale potvrzena pouze O-mannosylace (Xu, Takvorian, Cali, Orr, & Weiss, 2004a). Navíc byly při analýze genomu *Encephalitozoon cuniculi* nalezeny geny pro manosyltransferázy, které by mohli tuto glykosylaci katalyzovat. Geny pro některé enzymy nutné pro N-glykosylaci naopak v genomu identifikovány nebyly (Katinka et al., 2001). Obecně by manosylace mohla sloužit k navázání kontaktu s cytoplazmatickou membránou hostitelské buňky (Obr. 4), respektive s jejími manosovými receptory (Han et al., 2017).

PTP2 se nachází na stejném chromosomu jako PTP1 a vytváří společně s ním klastr (Delbac et al., 2001). Stejně jako PTP1 se nepochybně liší od známých proteinů a neobsahuje žádné domény. Tvoří jej cca 300 aminokyselin. Charakteristický je vysoký obsah lysinu, vyskytující se zejména ve střední části sekvence a stejně jako PTP1 obsahuje cystein, jehož umístění v rámci genu je konzervované napříč druhy (Obr. 5); podporuje to tedy hypotézu, že tvorba disulfidických můstků je nezbytná pro vznik struktury polární trubice. Rozdíly v sekvencích PTP2 u jednotlivých druhů jsou oproti PTP1 menší (Delbac et al., 2001).

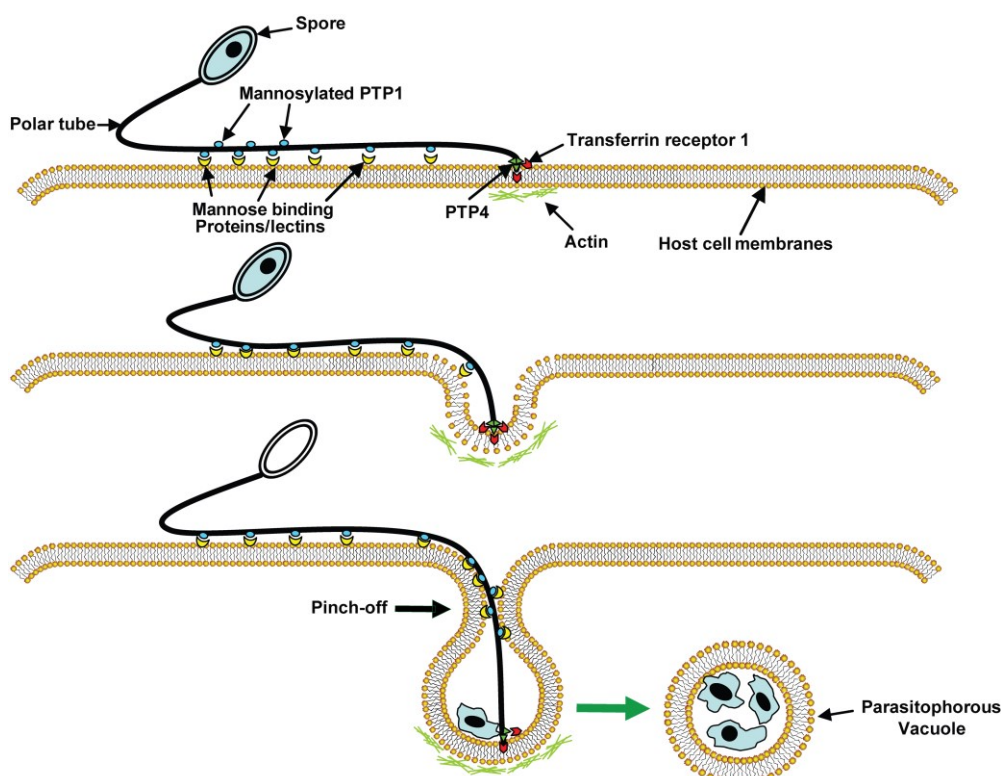
Pomocí experimentů s kvasinkovým dvouhybridním systémem bylo prokázáno, že PTP1 interaguje s PTP2 a stejně tak i s PTP3 *in vivo* (Bouzahzah et al., 2010).

PTP3 je velký protein skládající se z cca 1300 aminokyselin. Stejně jako předchozí PTP neobsahuje žádnou známou doménu a není podobný jiným známým proteinům. Na rozdíl od výše zmíněných proteinů však neobsahuje cystein a není tedy schopen tvořit disulfidické můstky. Mezi převažující aminokyseliny patří prolin, kyselina glutamová a kyselina asparagová. Předpokládá se, že před germinací interaguje v rámci polární trubice s PTP1 a PTP2 polymery pomocí iontových vazeb, a že tyto vazby zabraňují vystřelení trubice (Peuvel, Peyret, Méténier, Vivarès, & Delbac, 2002). Pro germinaci jsou důležité monovalentní ionty (Dall, 1983; Ishihara, 2011), jejich vstup do spory by mohl narušit iontové vazby PTP3 a zapříčinit tak následnou extruzi trubice (Peuvel et al., 2002).

Na základě nedávno publikované práce se předpokládá, že další protein označený jako PTP4 zprostředkovává interakci polární trubice a hostitelské buňky (Obr. 4). Dokáže se totiž vázat na TfR1 transferinový receptor, který se nachází na membráně hostitelské buňky (Han et al., 2017). Je možné, že existují i alternativní mechanismy, pomocí nichž se PTP4 váže na hostitelskou buňku. V jeho sekvenci byly identifikovány oblasti podobné doménám vázajícím chitin. Mimo chitinu by ale tyto domény mohli být schopné vázat i glykoproteiny nacházející se na hostitelské cytoplazmatické membráně (Han et al., 2017).

Funkce posledního proteinu PTP5, který se nachází v klastru s PTP4, zatím není prozkoumána (Han et al., 2017).

Rozložení proteinů v trubici není homogenní. PTP4 se například nachází pouze na konci polární trubice, což podporuje teorii, že slouží k navázání kontaktu s hostitelskou buňkou. Oproti tomu PTP1 se nachází po celé délce trubice (Han et al., 2017).



Obr. 4. Model mikrosporidiální infekce hostitelské buňky (Han et al., 2017); PTP1 se pomocí O-manosylace napojuje na manosové receptory, zatímco PTP4 interaguje s transferinovým receptorem 1. V součinnosti zprostředkovávají prvotní interakci s hostitelskou buňkou.

Podle snímků z transmisní elektronové mikroskopie není trubice před germinací dutá, nýbrž je vyplněna elektrondensním materiálem (Kudo & Daniels, 1955). Povaha tohoto materiálu zatím není objasněna, ale předpokládá se, že by mohlo jít o nepolymerizované proteiny polární trubice (Weidner, 1976). U některých druhů můžeme na příčném řezu trubicí pozorovat koncentrické kruhy, připomínající letokruhy (Manter, Canning, Curry, & Overstreet, 2002; Tokarev et al., 2010). Díky tomuto uspořádání trubice je možné, že se může teleskopicky vysouvat. To by vysvětlovalo skutečnost, že polární trubice je po vystřelení delší, než když je stočena uvnitř spory (Frixione et al., 1992). Jiným vysvětlením tohoto jevu může být vysoký obsah prolinu v PTP1, který zvyšuje elasticitu celé struktury.

Na povrchu polární trubice uvnitř spory se nachází membrána (Vinckier, Porchet, Vivier, Vávra, & Torpier, 1993). Ve starších studiích se můžeme setkat i s názorem, že je trubice obalena dvěma membránami (Liu & Davies, 1973). Jelikož se v těsné blízkosti trubice nachází polaroplast, organela tvořená systémem membrán, je možné, že pozorovaná druhá membrána patřila polaroplastu, nikoli polární trubicí.

	10	20	30	40	50
Nosema bombicis	---	MFLSLNRKLF	TVASLL	TVIRTM	---
Nosema ceranae	MTNMRNL	STLCLFMT	FYLLRI	KAFV	---
Nosema apis	---	MQDPNHSAM	STLPATAP	---	---
Ordospora colligata	---	MLLSFAVVA	FIGSCIAT	---	---
Encephalitozoon hellem	---	MLLLFTVVT	LVSAQV	---	---
Encephalitozoon romaleae	---	MLLLFTVVT	LVSTAQVP	---	---
Encephalitozoon cuniculi	---	MLLLLAITAV	VVSATMVH	---	---
Encephalitozoon intestinalis	---	MLLLLSAVAF	VVSATAV	---	---
Pseudoloma neurophilia	---	MLHKFSSVI	FITFYFLN	ELRT	---
Antonospora locustae	---	MKRLVSLVLL	YSILEPVF	ALSHGYG	SKYSVNAVSG
Spraguea lophii	MSRIRNI	FNVI	GYACSL	LN	VVNVAATAAAYS
	60	70	80	90	100
Nosema bombicis	---	ASVAPPQGG	IMVFN	---	RAQQQMLPAV
Nosema ceranae	---	GSVPPGNNY	VIPNGP	GGQAPNNS	DKPAILFPNDP
Nosema apis	---	LNATKPDNT	IPQAPPL	IRPNKC	---
Ordospora colligata	---	ETMVTKPM	TYPYTMH	---	TLPLQVQQGT
Encephalitozoon hellem	---	APVTPQA	AVPTQF	---	LPGAQQKIGG
Encephalitozoon romaleae	---	QTPASPTA	PTQF	---	LPGVQQKIGG
Encephalitozoon cuniculi	---	PSAVVPQ	PAAPLHV	---	VPPQQQ
Encephalitozoon intestinalis	---	QSGVVSQ	PTTPIPI	---	LPGQPM
Pseudoloma neurophilia	---	AQAVAPL	QGRSTSL	LVQDADA	AQKAQLANA
Antonospora locustae	---	SSGAVNNA	AAREKTL	---	LEQNRVLKAAIAQN
Spraguea lophii	MP	SAGTED	DMKSKS	NNLAALT	QGGIATNAL
	110	120	130	140	150
Nosema bombicis	NNNPAE	---	QQRDLIER	AKMR	---
Nosema ceranae	INK	---	EECQRRAY	EKGQQQHAA	---
Nosema apis	TKSPEEC	---	MQEAQMK	AERRKQEL	---
Ordospora colligata	V	---	SDCAKEL	QKKQEEKERNA	---
Encephalitozoon hellem	M	---	ADCPKRN	SEAANAMVQRA	---
Encephalitozoon romaleae	M	---	AEGCLKRN	SEAANAMFQRA	---
Encephalitozoon cuniculi	M	---	IECQKR	SEATKAMIERA	---
Encephalitozoon intestinalis	M	---	VECQKR	NAEATKAMVERA	---
Pseudoloma neurophilia	Q	---	NACSGQS	VEANLAQVNS	LANKCIAEK
Antonospora locustae	N	---	PKCKSS	SVDGNWSML	LQTKLNQDC
Spraguea lophii	MSQNP	---	MAGLTIE	GKAAELKQE	QVKQCFLQKQE
	160	170	180	190	200
Nosema bombicis	IKQEPK	---	VKSVDL	RETO	---
Nosema ceranae	KKQ	---	ECIRTV	SNASQEC	CLKNKIKKR
Nosema apis	KPE	---	ECIKTV	DPKEQQ	CLLVKKLQEK
Ordospora colligata	NK	---	CIKPTL	NGSDVCA	EQEFLKQAATN
Encephalitozoon hellem	PKDS	---	GGQCI	ERAVQGT	DRCILAKI
Encephalitozoon romaleae	PKDS	---	GGQCI	ERAVQGT	DRCILAKI
Encephalitozoon cuniculi	QKD	---	GGQCI	EKAVQGT	DRCILAGI
Encephalitozoon intestinalis	QKES	---	GGQCI	EKAVQGT	DRCILAGI
Pseudoloma neurophilia	EKD	---	VGVQKV	SPQAMNH	CHVKA
Antonospora locustae	SKE	---	CIKKLN	PNAMV	QARKVMS
Spraguea lophii	QNK	---	ECIVKY	DAKAGAC	NAEKVMGNI
	210	220	230	240	250
Nosema bombicis	KIMLAANI	QHH	---	FIKVEK	PPSEQFQIVK
Nosema ceranae	IVFI	---	GLRTQSH	---	YTLRHNGR
Nosema apis	LIFIAMRI	QSH	---	YAKHEPK	KAIPSTVK
Ordospora colligata	VIGLAVH	DRMT	---	---	TVPVKEKARE
Encephalitozoon hellem	LISLI	---	LNVDYGL	KPFFTV	VKKKTKRV
Encephalitozoon romaleae	LISLI	---	LNVDYGL	KPFFTV	VKKKTKRV
Encephalitozoon cuniculi	LIALI	---	VNVYGL	QPIITK	PKKKKSKIMANLP
Encephalitozoon intestinalis	LIALI	---	VNVYGL	QPIITK	PKKKKSKIMANLP
Pseudoloma neurophilia	PIMLT	---	TITENFG	---	YIAEAKDQ
Antonospora locustae	VKMM	---	GVVEKIH	---	YDVEKKNM
Spraguea lophii	DVLM	---	AVVETIS	---	YRVKPK
	260	270	280	290	300
Nosema bombicis	QTRKRP	---	APQ	---	CI
Nosema ceranae	T	---	PI	---	SKKKPY
Nosema apis	TKKNKP	---	---	---	KPQDCICPT
Ordospora colligata	G	---	---	---	PPSKPKDD
Encephalitozoon hellem	GTFFQD	---	---	---	NNDECK
Encephalitozoon romaleae	GTFFQD	---	---	---	NNDECK
Encephalitozoon cuniculi	GTFFQD	---	---	---	NNDECK
Encephalitozoon intestinalis	GTFFQD	---	---	---	NNDECK
Pseudoloma neurophilia	GELPQP	---	---	---	KKDNPC
Antonospora locustae	GKIPAA	---	---	---	---
Spraguea lophii	GELPKP	---	---	---	VQKEDDD
	310	320	330	340	
Nosema bombicis	NILSN	---	---	---	TTVSEPG
Nosema ceranae	NILSN	---	---	---	ATVDVSN
Nosema apis	EIVSN	---	---	---	STVTNVK
Ordospora colligata	IMYD	---	---	---	AMVQNN
Encephalitozoon hellem	LISRAI	---	---	---	QKKKEV
Encephalitozoon romaleae	LISRAI	---	---	---	QKKKEV
Encephalitozoon cuniculi	LISRAI	---	---	---	QKKKEV
Encephalitozoon intestinalis	LISRAI	---	---	---	QKKKEV
Pseudoloma neurophilia	SVQV	---	---	---	QKQSSDKK
Antonospora locustae	TVRP	---	---	---	GI
Spraguea lophii	GMTK	---	---	---	GNFKTDN

Obr. 5. Aligment proteinových sekvencí známých PTP2 (clustalW); červeně označeny konzervované pozice cysteinu

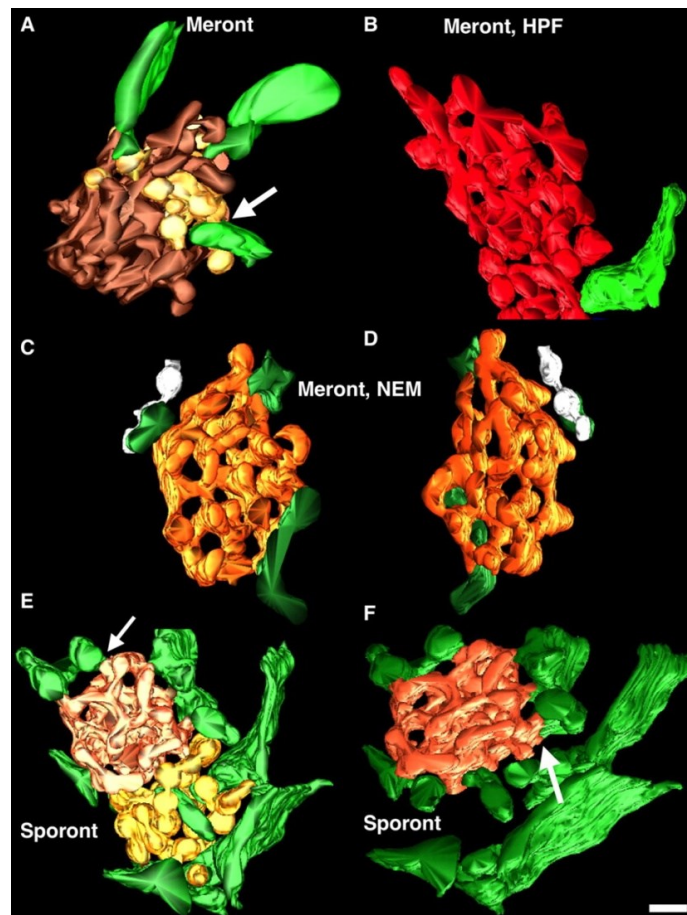
3 Biogeneze polární trubice

Během sporogonie začínají mikrosporidie exprimovat geny pro proteiny polární trubice a stěnu spory (Beznoussenko et al., 2007). N- konec těchto proteinů obsahují signální peptidy pro transport do endoplasmatického retikula (ER) (Delbac et al., 1998; Hayman, Hayes, Amon, & Nash, 2001). Po transportu do ER dále pokračují do Golgiho komplexu (GK), kde dochází k jejich glykosylaci (Xu, Takvorian, Cali, Orr, & Weiss, 2004b).

GK se kromě glykosylace pravděpodobně podílí i na transportu proteinů do jejich místa určení. U mikrosporidií (Obr. 6) je GK značně odlišný od „klasického“ uspořádaného komplexu cisteren a váčků, jak ho známe např. u živočišných buněk. Ve stadiu meronta a sporonta mikrosporidie postrádají výrazný GK. Ve stadiu sporoblastu, kdy se začíná formovat polární trubice, se GK značně zvětšuje a vytváří síť trubic s průměrem kolem 30 nm. Tato síť je napojena na endoplasmatické retikulum, cytoplasmatickou membránu a tvořící se polární trubici. Proteiny stěny a polární trubice se pomocí této sítě dopravují na svá místa a přitom jsou glykosylovány (Beznoussenko et al., 2007; Takvorian et al., 2013).

Mikrosporidiální GK ale není neobvyklý pouze svou morfologií. Nebyly v něm totiž nalezeny COP váčky, které by měli být pro správné fungování GK nezbytné (Takvorian et al., 2013). Odporuje to zažité představě o retrográdním a anterográdním transportu, pomocí něhož se váčky obalené proteinovými komplexy COP-I nebo COP-II pohybují mezi jednotlivými kompartmenty GK nebo mezi GK a endoplasmatickým retikulem. Nicméně ze studia genomu *E. cuniculi* vyplývá, že geny pro tvorbu COP-I a COP-II jsou přítomny, ale v nekompletní podobě; COP-I a COP-II *E. cuniculi* postrádají oproti běžným COP váčkům po jedné podjednotce (Beznoussenko et al., 2007).

Váčky z GK mikrosporidií se zatím nepodařilo blíže specifikovat. Obsah i membrána těchto váčků slouží ke vzniku zprvu neorganizované struktury, z níž se posléze stává polární trubice (Vinckier, Porchet, Vivier, Vávra, & Torpier, 1993).



Obr. 6. 3D rekonstrukce Golgiho systému u *Paranosema grylli* (Beznoussenko et al., 2007); **A** – obecný pohled na tubulární systém meronta, zeleně endoplasmatické retikulum, hnědě tubulární část Golgi, žlutě vezikulární část Golgi. Šipka ukazuje napojení Golgiho aparátu na endoplasmatické retikulum, **B** – tubulární systém meronta připraven zmražením při vysokém tlaku a kryosubstitucí, **C,D** - tubulární systém meronta připraven chemickou fixací **E,F** - tubulární systém sporonta připraven chemickou fixací. Šipka ukazuje napojení Golgiho aparátu na endoplasmatické retikulum

4 Stěna spory

Stěna spory se skládá z vnitřní elektronlucentní vrstvy široké 30 – 35 nm, tzv. endospory, a vnější elektrondensní vrstvy široké 25 – 30 nm, tzv. exospory. Exospora je dále složena ze tří vrstev. Vnější vrstvu tvoří drobné výběžky, pod ní se nachází elektronlucentní intermediální lamina, vnitřní vrstvu pak tvoří vláknitá struktura (Bigliardi, Gatti, & Sacchi, 1997; Y. Li et al., 2009).

Šířka stěny je homogenní po celém obvodu spory s výjimkou kotvícího disku, kde je endospora slabší a více elektrondensní (Bigliardi, Gatti, & Sacchi, 1997).

Stěna se skládá jednak z proteinů (Bohne et al., 2000; Prigneau, Achbarou, Bouladoux, & Mazier, 2000), ale majoritní složkou je chitin, který zřejmě propůjčuje spoře odolnost vůči vnějším vlivům (Erickson & Blanquet, 1969). Zda chitin hraje roli i při germinaci zatím není známo.

Chitin je polysacharid tvořený molekulami N-acetylglukosaminu, které jsou vzájemně propojeny 1,4- β -glykosidickou vazbou. Tyto řetězce tvoří antiparalelním uspořádáním síť, která je nezbytnou složkou buněčné stěny hub (Lenardon, Munro, & Gow, 2010). U patogenních houbových organismů bývá chitin často překryt jinou vrstvou, například mananovou, jelikož imunitní systém hostitele dokáže chitin snadno rozpoznat (Netea MG & Gow NA, 2006); u mikrosporidií je chitin kryt vrstvou proteinů (Bohne et al., 2000). Přítomnost chitinu ve stěně spory potvrzuje současný pohled na fylogenezi mikrosporidií, kdy jsou považovány za odvozené houby (Quandt et al., 2017).

Proteiny spory s chitinem interagují pomocí konzervovaných chitin-vázajících motivů, které jsou bohaté na cystein a glycin. U některých proteinů tyto motivy chybí, ale jejich sekvence obsahují hodně cysteinu a je tedy pravděpodobné, že se také dokáží vázat na vrstvu chitinu ve stěně spory (D. Yang et al., 2018).

Ve stěně spory byly nalezeny i tzv. cytokeratiny (Manter et al., 1990). Spojitost těchto proteinů s germinací byla zkoumána u *Spraguea lophii*, mikrosporidie napadající nervovou soustavu *Lophius piscatorius* (Mansour, Ben Hassine, Vivares, & Cornillot, 2013), jelikož vystřelení vlákna doprovází rozpad struktur tvořených těmito proteiny. Navíc bylo experimentálně ověřeno, že tyto proteiny mohou být fosforylovány, což by mohlo zapříčinit strukturní změny ve stěně spory (Weidner & Halonen, 1993). Nicméně zatím existuje příliš málo důkazů na usuzování konkrétních souvislostí germinace s těmito proteiny.

Proteiny stěny spory jsou zkoumány zejména u mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* a také u *N. bombycis*. U *E. intestinalis* a *E. cuniculi* byly doposud objeveny proteiny SWP1, SWP2, Enp1, Enp2 a EcCDA, zatímco u *N. bombycis* proteiny SWP32, SWP30, SWP26, SWP25, SWP5, SWP7 a SWP9 (Z. Li et al., 2012; Donglin Yang et al., 2015). Jejich přesnou funkci zatím většinou neznáme. Některé ale prokazatelně interagují s proteiny polární trubice a zřejmě tedy participují při germinaci.

Příklad takového proteinu je SWP5, který jednak interaguje s PTP2 a PTP3, zároveň byl ale nalezen i v trubici samotné (Z. Li et al., 2012). Tento protein je také schopen chránit sporu proti fagocytóze. Předpokládá se, že funguje podobně jako protein RodAp u *Aspergillus*

fumigatus, který zabraňuje rozpoznání patogena pomocí tzv. MAMP (microbe-associated molecular patterns) receptory makrofágů (Cai, Lu, & Qiu, 2011; Dagenais et al., 2010).

Podobným příkladem může být SWP9, u něhož byla objevena interakce s PTP1, PTP2 i PTP3 a zároveň se nachází na začátku polární trubice v blízkosti kotvícího disku. Tento protein by tak mohl hypoteticky sloužit při vývoji polární trubice, zejména během jejího skládání z menších méně organizovaných úseků a k napojení trubice ke kotvícímu disku (Donglin Yang & Li, 2016).

I proteiny stěny, které se nenachází přímo v polární trubici, však mohou pomáhat s napadením hostitelské buňky. Například protein Enp1 nacházející se v endospoře, exospoře a zejména v oblasti kotvícího disku, interaguje s povrchem hostitelské buňky (Southern, Jolly, Lester, & Hayman, 2007).

Z výše zmíněných poznatků vyplývá, že stěna spory hraje důležitou roli při napadení hostitelské buňky a je nesporně součástí invazního aparátu mikrosporidií. Jelikož se některé proteiny nachází ve stěně i přímo v polární trubici, vyvstává otázka, zda polární trubice nemá původ právě ve stěně spory.

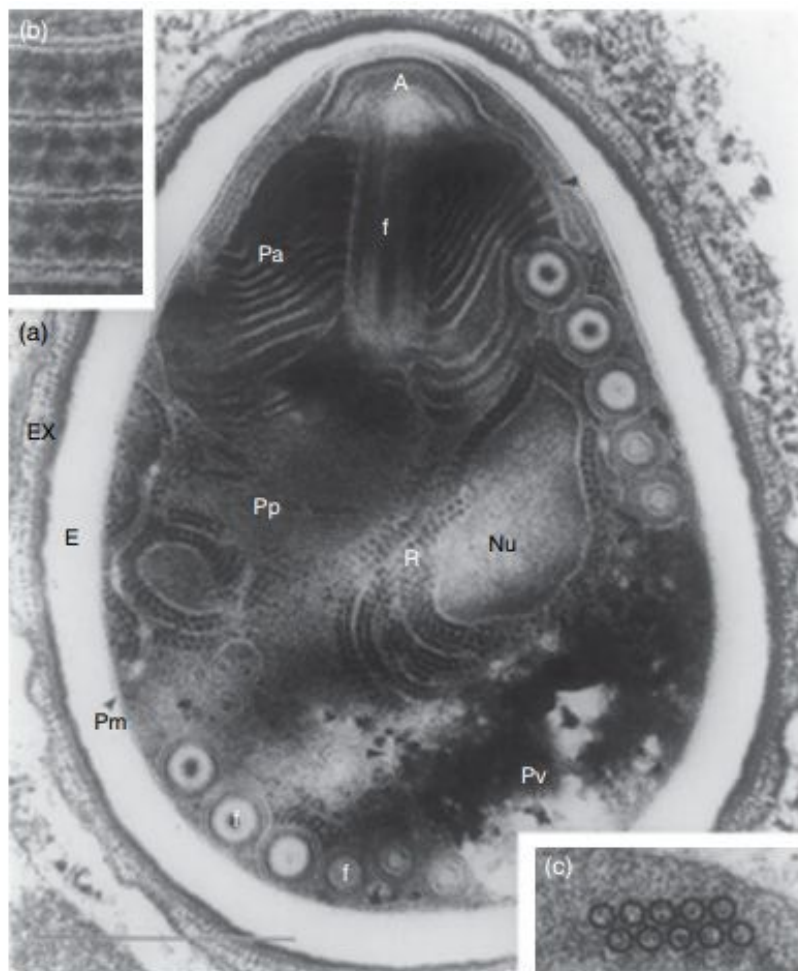
5 Polaroplast

Polaroplast je organela mikrosporidií tvořená systémem cisteren, u nichž můžeme odlišit vnitřní matrix a povrchovou membránu (Weidner, 1970). Slouží pravděpodobně jako rezervoár cytoplasmatické membrány pro vystlání extrudované polární trubice a pro sporoplasmu, která jí projde do hostitelské buňky (Weidner, Byrd, Scarborough, Pleshinger, & Sibley, 1984).

Přestože polaroplast pravděpodobně hraje při germinaci velmi důležitou roli nejenom jako poskytovatel nové cytoplasmatické membrány pro sporoplasmu (viz. Kapitola Germinace), počet studií zabývajících se polární trubicí je mnohonásobně větší, a jeho přesná funkce v mechanismu germinace zatím zůstává neprozkoumána.

Dle tvaru cisteren můžeme polaroplast rozdělit na lamelární a vezikulární. Na anteriorní straně spory se nachází lamelární polaroplast, který přechází ve vezikulární polaroplast nacházející se spíše ve středu spory (Obr. 7). Lamelární polaroplast je tvořen systémem membrán napojených na kotvící disk, jež jsou poměrně těsně u sebe a kolmo na polární trubici, zatímco vezikulární polaroplast je tvořen vácíky a tubuly (Chioralia, Trammer, Maier, & Seitz, 1998).

Z ultrastrukturních pozorování vyplývá, že polaroplast je pravděpodobně derivátem GK (Jensen & Welling, 1972; Sprague & Vernick, 1969). Z jiných ultrastrukturních pozorování, však bylo usuzováno, že se jedná spíše o derivát endoplasmatického retikula (Weidner, 1970). Je možné, že polaroplast vzniká součinností jak GK, tak ER.



Obr. 7. Ultrastruktura spory (Vávra & Larsson, 2014); **a** – podélný řez sporou, **b** – polyribozomy spojené s membránou, **c** – cirkulárně uspořádané polyribozomy; **A** – kotvící disk, **E** – endospora, **EX** – exospora, **f** – polární trubice, **Nu** – jádro, **Pa** – lamelární polaroplast, **Pm** – plasmatická membrána, **Pp** – vezikulární polaroplast, **Pv** – posteriorní vakuola, **R** - polyribozomy

6 Faktory ovlivňující germinaci

Germinace je proces při němž dojde k aktivaci spory, vystřelení polární trubice a přenosu sporoplasmy do hostitelské buňky (Xu & Weiss, 2005). Nejvíce zkoumanými a zřejmě klíčovými faktory pro zahájení germinace jsou pH vnějšího prostředí, monovalentní ionty a teplota. Optimální podmínky jsou druhově specifické.

Zásadité pH je optimální pro germinaci spor mnoha druhů, například pro *N. algerae* je optimum pH 9,5, pro *Glugea fumiferanae* pH 10,8 a pro *Amblyospora inimica* pH 9 (Ishihara, 2011; Albert H. Undeen & Avery, 1988a; Undeen, 1990). Tyto druhy mikrosporidií jsou nicméně často schopné germinace i v kyselých podmínkách, zatímco při neutrálním pH 7 dojde ke germinaci jen výjimečně (A. H. Undeen & Avery, 1988b). Můžeme se setkat i s druhy, které vyžadují nejprve více alkalické pH a poté jeho snížení, například u *Variomorpha ploidae* z pH v rozmezí 10,5 až 11,5 do rozmezí 8 až 10 (Malone, 1984). Vzácněji se můžeme setkat i s druhy pro něž je optimální pouze kyselé prostředí, například *Vavraia culicis* (Albert H Undeen, 1983).

Koncentrace monovalentních iontů pozitivně koreluje s úspěšností germinace spor. Původně se předpokládalo, že spuštění germinace vyžaduje pouze kationty (Dall, 1983). Později se experimentálně prokázal i vliv aniontů. Účinnost iontů je však současně závislá na hodnotě pH. Při optimálním pH pro germinaci *N. algerae* například působí z aniontů nejefektivněji Br^- , méně silně Cl^- a I^- a nejslaběji působí F^- . Pokud však přejdeme do kyselého pH, nejúčinnější je právě F^- (A. H. Undeen & Avery, 1988b). Síla účinku iontů na germinaci ale není ovlivněna pH stejnoměrně. Například účinnost kationtů při vyvolávání germinace u spor *G. fumiferanae* je v následujícím pořadí: $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$; na účinnost Cs^+ působí změny pH nejméně, zatímco na účinnost Li^+ nejvíce (Ishihara, 2011). Pokud jsou spory dlouhodobě vystaveny nízké koncentraci potřebných iontů, dojde k jejich inaktivaci a nejsou schopny germinace ani při zvýšení koncentrace iontů na optimální úroveň. Tento efekt je reverzibilní, pokud se spory dostanou do kontaktu s vodou, jsou po nějaké době opět schopné germinace (Albert H Undeen, 1983).

Spory pro germinaci potřebují i teplotní optimum. Experimenty prováděné na *N. algerae* ukazují, že snížení teploty prodlužuje lag fázi germinace, ale nemá vliv na její úspěšnost (Albert H. Undeen & Avery, 1988a). Pokud teplota klesne pod určitou hranici, úspěšnost germinace se drasticky snižuje; u *G. fumiferanae* bylo měřeno teplotní spektrum od 10 °C do 40 °C. Při deseti stupních bylo schopno úspěšné germinace pouze 20 % spor, zatímco při dvaceti stupních téměř 70 %. Teplotní optimum se u tohoto druhu pohybuje okolo

30 stupňů, stejně jako například u *Nosema apis* (Malone, Gatehouse, & Tregidga, 2001) nebo *Nosema caranae* (Martín-Hernández et al., 2009). Při překročení optima směrem nahoru je pokles schopnosti germinace ještě markantnější; při 40 °C pouze kolem 5 % (Ishihara, 2011).

7 Germinace

Proces germinace se sestává ze čtyř fází (Obr. 8): aktivace spory, zvýšení intrasporálního osmotického tlaku, vystřelení polární trubice a průchodu sporoplasmy skrze trubici (Xu & Weiss, 2005).

K aktivaci dochází u různých druhů za odlišných podmínek, odpovídajících habitatu, jenž obývají (Ishihara, 2011; Tobias, 1948). Přesný průběh aktivace však není znám u žádného druhu. Předpokládá se, že je způsoben změnami ve stěně spory, kdy dochází k narušení proteinové sítě (Weidner & Halonen, 1993). Při aktivaci spory také dochází k hromadění Ca^{2+} uvnitř polaroplastu, což by mohlo souviset se zvětšováním objemu polaroplastu o 15 – 25%, které předchází vystřelení trubice (Weidner & Byrd, 1982).

Přítomnost Ca^{2+} na membráně polaroplastu je zřejmě pro germinaci zásadní. Je několik teorií, jak by mohli ionty vápníku ovlivňovat změny v polaroplastu před everzí trubice. Jedna z možností je, že se vápník transportuje z membrány do matrix polaroplastu a zpět, při každé relokaci do matrix dochází ke změně v jeho struktuře, což má za následek pozorovatelné kontrakce a rozvolňování struktury polaroplastu. Druhou možností by mohla být existence submembránového kontraktálního aparátu v polaroplastu, který by byl citlivý na Ca^{2+} . Třetí možností je, že navázání velkého množství Ca^{2+} na fosfolipidy vyvolá kontrakce a bobtnání přímo, bez nutnosti transportu mezi matrix a membránou (Weidner & Byrd, 1982). Tato možnost nebyla zkoumána přímo na polaroplastu, ale vyplývá ze studií zabývajících se vlivem vápníku na membrány (Papahadjopoulos, 1968; Rojas & Tobias, 1965). Totožnost vlastního molekulárního mechanismu či alespoň Ca^{2+} -vazebných proteinů je však zcela neznámá.

Po aktivaci spory se začne zvyšovat osmotický tlak uvnitř spory, což vede pravděpodobně k vystřelení polární trubice (Albert H. Undeen & Frixione, 1990). Mechanismus opět není zcela jasný a existuje několik teorií. Jedna hovoří o zvýšení permeability stěny spory k vodě (Lom & Vávra, 1963). Další z nich hovoří o tvorbě protonového gradientu, kdy dochází k odtoku protonů a vtoku kationtů do sporoplasmy, což vede k osmotické nestabilitě, následnému vtoku vody do buňky a bobtnání polaroplastu a

posteriorní vakuoly (Dall, 1983a). Tato teorie vznikla v době, kdy se předpokládalo, že všechny mikrosporidie potřebují pro germinaci kationty a alkalické pH. Dnes však známe i mikrosporidie, jež tyto podmínky nevyžadují, a tento mechanismus tedy nemůže platit obecně.

Další teorie bere v potaz štěpení cukrů. Cukry hrají roli ve zvýšení osmotického potenciálu ale zřejmě pouze u mikrosporidií obývajících vodní habitaty; u terestrických zástupců nebyly během germinace žádné změny cukerných složek spor zaznamenány a mechanismus tedy musí fungovat na základě jiného principu. (Albert H Undeen & Meer, 1999).

Konkrétně jde o disacharid trehalózu, který se během germinace štěpí za vzniku glukózy. Toto štěpení je u vodních mikrosporidií patrně hlavním regulátorem vnitřního tlaku spory a její masivní štěpení by mohlo vyvolat dostatečný tlak pro zahájení germinace (Albert H. Undeen & Frixione, 1990). Změny v množství cukrů byly například měřeny u *N. algerae*, kde se během germinace rozložilo 70% trehalózy na redukující cukry, z nichž tvořila glukóza téměř 80%. Ostatními vzniklými redukujícími cukry by mohli být fruktóza a manóza (Undee & Meer, 1994).

Enzym odpovědný za štěpení trehalózy je trehaláza, která je pravděpodobně separována od trehalózy a k jejich kontaktu dojde při nastání vhodných podmínek ke germinaci (Undeen, 1990). Optimální podmínky pro trehalázu jsou druhově specifické. Trehaláza výše zmiňované *N. algerae* například nejlépe katalyzuje štěpení při pH 5,5 (Albert H. Undeen, ElGazzar, Vander Meer, & Narang, 1987). Naproti tomu trehaláza *N. apis* má optimum při pH 7 (Vandermeer & Gochnauer, 1971).

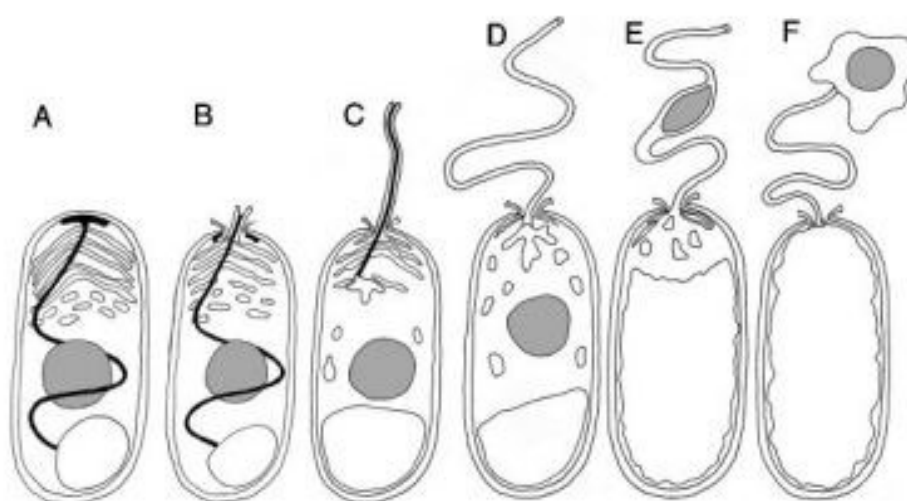
V porovnání s výše zmíněnými je poměrně nová teorie beroucí v potaz nález katalázy a acyl-CoA oxidázy v posteriorní vakuole; tedy enzymů běžně se vyskytujících v peroxisomech. Oxidace mastných kyselin s dlouhým řetězcem, při níž vzniká voda a O₂, dle této teorie způsobuje nárůst objemu posteriorní vakuoly, která následně mechanickým tlakem spustí germinaci (Findley et al., 2005). Při oxidaci vzniká v peroxisomech také peroxid vodíku. Tudíž tuto teorii podporují i experimenty demonstrující pozitivní účinek externě přidaného peroxidu vodíku na germinaci (Weidner & Findley, 2003). Přestože byly v posteriorní vakuole nalezeny enzymy typické pro peroxisomy, neexistuje přímý důkaz, že by se posteriorní vakuola vyvinula z peroxisomu.

Vystřelení trubice často předchází protruze na apikální straně spory v oblasti kotvícího disku (Frixione et al., 1992). Z tohoto místa posléze trubice vystřelí a zároveň dojde k jejímu

obrácení na ruby (Lom & Vávra, 1963). Celý proces se odehraje do 2 vteřin (Weidner, 1972); během něho můžeme pozorovat výrazné záškuby spory (Frixione et al., 1992).

Vlákno po vystřelení nejprve tvoří spirálu, která se vine proti směru hodinových ručiček, což je pravděpodobně důsledek spirálního uspořádání ve sporoplasmě před vystřelením. V poslední fázi germinace se trubice narovná a během přibližně 0.2 vteřiny můžeme pozorovat objevení kapky sporoplasmy na konci trubice. Objem této kapky je větší než by se dalo předpokládat na základě odhadu objemu spory samotné (Frixione et al., 1992). Sporoplasma je trubicí protlačena pravděpodobně pomocí bobtnání posteriorní vakuoly a tím způsobeného mechanického tlaku (Lom & Vávra, 1963).

Sporoplasma během procesu získá novou plasmatickou membránu, zatím co původní zůstává v obalu spory. Původ této membrány byl zkoumán pomocí fluorescenčního značení a zdá se, že se jedná o membránu polaroplastu (Weidner, Byrd, Scarborough, Pleshinger, & Sibley, 1984).



Obr. 8. Průběh germinace (Keeling & Fast, 2002); **A** – dormantní spora obsahující polární vlákno (černě), jádro (šedě), posteriorní vakuolu a polaroplast, **B** – prasknutí kotvícího disku a bobtnání polaroplastu, **C** – everze a vystřelení polární trubice, bobtnání posteriorní vakuoly **D** – bobtnající posteriorní vakuola tlačí na sporoplasma, **E** – sporoplasma prochází polární trubicí, **F** – sporoplasma je protlačena skrze polární trubicí

8 Invaze do hostitelské buňky

Existují dva pohledy na způsob, jakým se uvolněná sporoplasma dostane do hostitelské buňky. Původní názor předpokládal, že polární trubice prorazí cytoplasmatickou membránu hostitelské buňky a sporoplasma projde skrze trubici přímo do cytoplasmy (Iwano & Ishihara, 1989). Novější teorie nepředpokládá, že by měla polární trubice dostatečnou sílu k proražení cytoplasmatické membrány. Trubice pouze zatlačí na membránu, vytvoří z ní kapsu, do níž následně přejde sporoplasma a vytvoří se tak parazitoformní vakuola (Bohne, Böttcher, & Groß, 2011). Tato nová teorie vychází ze studií zabývajících se rodem *Encephalitozoon*, který jako jediný známý rod mikrosporidií vytváří parazitoformní vakuolu (Sprague & Vernick, 1971), a je tedy možné, že oba dva pohledy jsou správné.

Parazitoformní vakuolu u rodu *Encephalitozoon* tvoří membrána odvozená pouze z cytoplasmatické membrány hostitelské buňky, nikoli mikrosporidie. Vzniká současně s extruzí sporoplasmy z polární trubice a celý proces trvá méně než 1.3 vteřiny (Rönnebäumer, Gross, & Bohne, 2008). Vakuola nemá na svém povrchu markery potřebné pro vstup do endocytické dráhy hostitelské buňky a zdá se, že se nijak neúčastní vezikulárního transportu (Fasshauer, Gross, & Bohne, 2005). Na povrchu vakuoly ale můžeme nalézt póry velikosti do 10 kDa, přes něž pravděpodobně probíhá výměna metabolitů (Rönnebäumer et al., 2008).

Mikrosporidie však zřejmě dokážou využívat i fagocytózy. Byly totiž pozorovány celé spory s vystřelenou polární trubicí uvnitř buněk. Usuzuje se, že se spory dostaly do buněk fagocytózou, následně germinovaly ve fagolysosomech a pomocí trubice se sporoplasma dostala do hostitelské cytoplazmy (Couzin et al., 2000).

Přestože mikrosporidiální genom je extrémně redukován (Corradi, Pombert, Farinelli, Didier, & Keeling, 2010), kóduje několik stovek proteinů sloužících k interakci s hostitelem (Reinke et al., 2017). Tyto proteiny obsahují trans-membránové domény a různé signální sekvence. Některé se dostávají i do jádra hostitele, kde mohou ovlivňovat transkripci nebo jadernou organizaci. Tyto proteiny jsou velmi odlišné u různých druhů mikrosporidií, a to i v rámci rodů (Reinke et al., 2017).

9 Evoluce polární trubice

Polární trubice mikrosporidií je vysoce specializovaným invazním aparátem, přesto u blízce příbuzných ze skupiny Rozellomycota můžeme nalézt podobné aparáty. Na základě nejenom tohoto faktu se zdá, že mikrosporidie se vyvinuly právě z této skupiny (Corsaro, et al., 2016).

Na bázi této skupiny sedí rod *Rozella* (Corsaro, et al., 2016). Tvoří jej intracelulární parazité napadající poměrně širokou škálu hostitelů, zahrnující houby, stramenopila nebo řasy (Letcher et al., 2017). Stejně jako mikrosporidie zástupci rodu *Rozella* vytvářejí trubici, i když výrazně kratší, pomocí níž injikují tzv. protoplast do hostitelské buňky. Na rozdíl od mikrosporidií ale tato trubice vzniká až po kontaktu s hostitelskou buňkou. Další shodným znakem je přítomnost distální vakuoly (u mikrosporidií označována jako posteriorní vakuola), která pravděpodobně pomáhá s pohybem protoplastu skrze trubici (Held, 1973).

Podobně jako většina mikrosporidií nevytváří parazitoformní vakuolu, ale jsou volně v cytoplazmě hostitelské buňky, kterou ale navíc aktivně fagocytují, včetně okolních organel. Na rozdíl od mikrosporidií, které si zachovaly pouze relikty mitochondrií a mitosomy, mají také zachované klasické mitochondrie (Burri, Williams, Bursac, Lithgow, & Keeling, 2006; Powell, 1984).

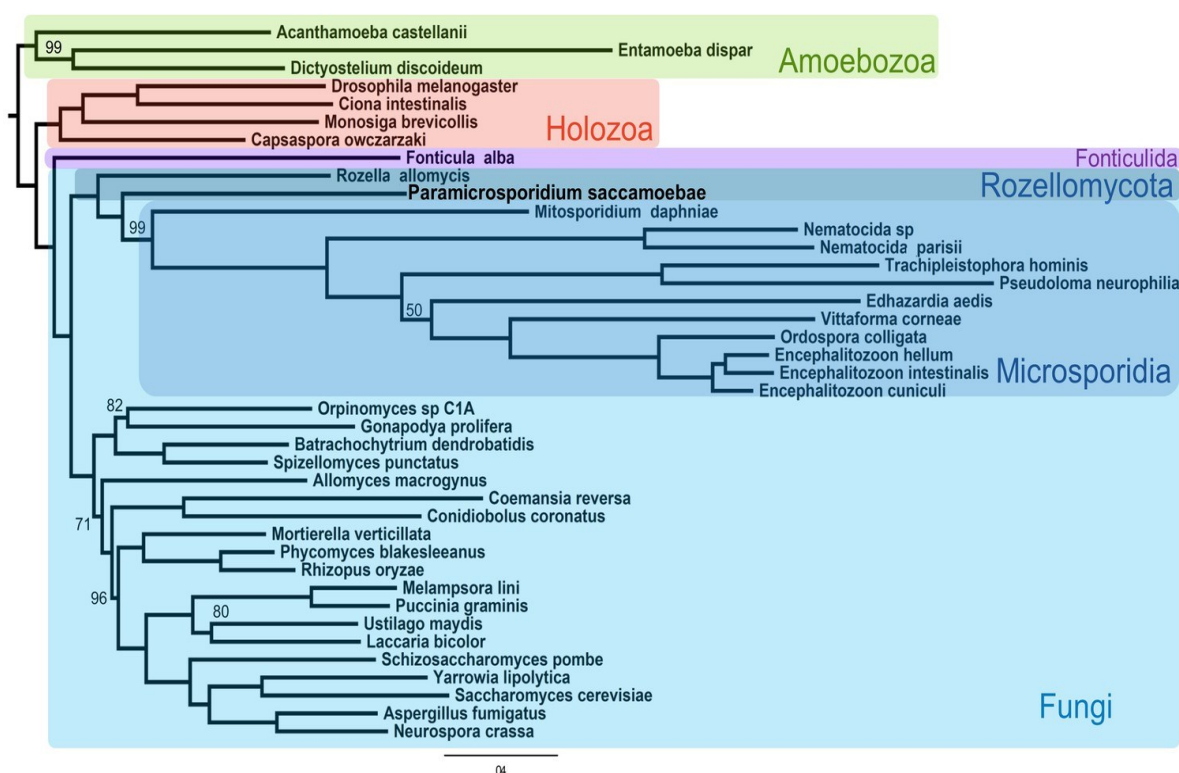
Pravděpodobně bližším příbuzným než rod *Rozella* v rámci Rozellomycota je *Paramicrosporidium saccamoebae*, které již svou morfologií i životním cyklem mikrosporidie připomíná. Stadium meronta je volně v hostitelově cytoplazmě a následně tvoří spory bez bičíku. Navíc je zde ve stadiu spory viditelná polární trubice. Místo pravidelných obrátek okolo sporoplasmy je ale neorganizovaně rozložena v objemu sporoplasmy (Daniele Corsaro et al., 2014).

Příbuzenské vztahy budou ale ve skupině Rozellomycota problematické, jelikož se pravděpodobně jedná o parafylum. U *P. saccamoebae* byl totiž objeven mitochondriální genom typický pro houby, který obsahuje kompletní složení mitochondriálního komplexu I. Ten ale nenajdeme u *Rozella allomycis*, která by měla být méně odvozená než *P. saccamoebae* nebo mikrosporidie (Quandt et al., 2017).

Bazální linii mikrosporidií představuje druh *Mitosporidium daphniae*. Morfologicky je velmi podobná klasickým mikrosporidiím, přestože její polární trubice je velmi krátká a tvoří pouze dvě obrátky okolo sporoplasmy (Haag et al., 2014). Z toho by bylo možné usuzovat, že se v evoluci polární trubice prodlužovala a mikrosporidie s krátkou polární trubicí, jako například *M. tetraspora* (Bylén & Larsson, 1996), jsou evolučně starší.

M. daphniae se ale liší od ostatních mikrosporidií přítomností genů pro získávání ATP skrze citrátový cyklus a oxidativní fosforylaci (Haag et al., 2014). Ostatní mikrosporidie využívají ATP generované hostitelskou buňkou. K tomu používají ATP transportéry, které získaly horizontálním genovým transferem od parazitických bakterií (Tsaousis et al., 2008). Stejně geny pro získávání ATP od hostitele, ale mají i zástupci rodu *Rozella*, a je tedy možné, že buď došlo u *M. daphniae* k jejich sekundární ztrátě nebo je mikrosporidie a druhy rodu *Rozella* získaly nezávisle na sobě. Možný je i scénář, podle kterého tyto geny u *M. daphniae* divergovaly natolik, že je již není možné rozpoznat klasickými bioinformatickými nástroji (Haag et al., 2014).

Fylogeneze mikrosporidií a jim příbuzných organismů (Obr. 9) je značně komplikovaná. Došlo zde k mohutným ztrátám genů i k horizontálnímu genovému transferu, což činí rekonstrukci fylogenetických vztahů obtížnou. Navíc ortologní geny u jednotlivých skupin velmi rychle divergují, což se projevuje i např. velkou odlišností primárních sekvencí proteinů tak konzervované struktury, jakou je polární trubice.



Obr. 9. Maximum likelihood fylogenetický strom vytvořený na základě analýzy sekvence 53 proteinů ukazující současné postavení mikrosporidií a Rozellomycota (Quandt et al., 2017)

10 Závěr

Tato práce shrnuje současné poznatky o invazním aparátu mikrosporidií a o mechanismu invaze. Většina těchto poznatků se týká polární trubice, přestože součástí invazního aparátu jsou i polaroplast, posteriorní vakuola a stěna spory.

Nedávná zjištění demonstrující, že některé proteiny stěny nejenom interagují s proteiny polární trubice, ale i se v trubici přímo nacházejí, ukazují na komplexnost biogeneze invazního aparátu a funkční propojení těchto odlišných struktur. Stěna spory navíc zřejmě hraje klíčovou roli v iniciaci germinace a její studium je tedy pro pochopení tohoto procesu klíčové.

Ze stěny spory se signál pro germinaci přenáší dovnitř buňky, do ostatních částí invazního aparátu. Ačkoli víme, že polaroplast neslouží pouze jako membránový rezervoár, jeho role v celém procesu není prozkoumána, což je zapříčiněno především velmi malým počtem studií zaměřených na toto téma.

O posteriorní vakuole toho víme ještě méně než o polaroplastu. Často je zmiňována pouze jako generátor mechanického tlaku pro protlačení sporoplasmy skrze trubici, avšak nález enzymů, které se běžně vyskytují v peroxisomech, nám ukazuje, že by si i tato organela zasloužila bližší prozkoumání.

Vystřelení polární trubice a průchod sporoplasmy skrze ni je vlastně až konečnou fází germinace, i když jí je věnována největší pozornost. Přesto i polární trubice a zejména její interakce s hostitelskou cytoplasmatickou membránou potřebují další výzkum.

Objasnění mechanismu germinace mikrosporidií je tedy i po více než sto letech výzkumu stále výzvou.

11 Použitá literatura

- Beznoussenko, G. V., Dolgikh, V. V., Seliverstova, E. V., Semenov, P. B., Tokarev, Y. S., Trucco, A., ... Mironov, A. A. (2007). Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular mechanisms of function. *Journal of Cell Science*, 120, 1288–1298.
- Bigliardi, E., Gatti, S., & Sacchi, L. (1997). Ultrastructure of microsporidian spore wall: The encephalitozoon cuniculi exospore. *Italian Journal of Zoology*, 64:1, 1–5.
- Bohne, W., Böttcher, K., & Groß, U. (2011). The parasitophorous vacuole of Encephalitozoon cuniculi: Biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen interface. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 395–399.
- Bohne, W., Ferguson, D. J. P., Kohler, K., Gross, U. W. E., Hospital, J. R., & Ox, O. (2000). Developmental Expression of a Tandemly Repeated , Glycine- and Serine-Rich Spore Wall Protein in the Microsporidian Pathogen Encephalitozoon cuniculi, 68, 2268–2275.
- Bouzahzah, B., Nagajyothi, F., Ghosh, K., Takvorian, P. M., Cali, A., Tanowitz, H. B., & Weiss, L. M. (2010). Interactions of encephalitozoon cuniculi polar tube proteins. *Infection and Immunity*, 78, 2745–2753.
- Burri, L., Williams, B. A. P., Bursac, D., Lithgow, T., & Keeling, P. J. (2006). Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 15916–15920.
- Bylén, E. K. C., & Larsson, J. I. R. (1996). Ultrastructural study and description of Mrazekia tetraspora Léger & Hesse, 1922 and transfer to a new genus Scipionospora n. g. (Microspora, Caudosporidae). *Europ. J. Protist.*, 32, 104–115.
- Cai, S., Lu, X., & Qiu, H. (2011). Identification of a Nosema bombycis (Microsporidia) spore wall protein corresponding to spore phagocytosis. *Parasitology*, 138, 1102–1109.
- Cali, A., & Takvorian, P. M. (2014). Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity* (pp. 71–133).
- Chioralia, G., Trammer, T., Maier, W. A., & Seitz, H. M. (1998). Morphologic changes in Nosema algerae (Microspora) during extrusion. *Parasitol. Res.*, 84, 123–131.
- Corradi, N., Pombert, J.-F., Farinelli, L., Didier, E. S., & Keeling, P. J. (2010). The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian Encephalitozoon intestinalis. *Nature Communications*, 1, 1–7.
- Corsaro, D., & Et al. (2016). Atlas of Science From parasitic microfungi towards the origins

- of Microsporidia. *Atlas of Science*, 1–3.
- Corsaro, D., Walochnik, J., Venditti, D., Steinmann, J., Müller, K. D., & Michel, R. (2014). Microsporidia-like parasites of amoebae belong to the early fungal lineage Rozellomycota. *Parasitology Research*. doi:10.1007/s00436-014-3838-4
- Couzinet, S., Cejas, E., Schittny, J., Deplazes, P., Weber, R., & Zimmerli, S. (2000). Phagocytic Uptake of Encephalitozoon cuniculi by Nonprofessional Phagocytes, 68, 6939–6945.
- Curgy, J. J., Vávra, J., & Vivares, C. (1980). Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biologie Cellulaire*, 38, 49–51.
- Curry, A., & Canning, E. U. (1993). Human microsporidiosis. *Journal of Infection*, 27, 229–236.
- Dagenais, T. R. T., Giles, S. S., Aimaniananda, V., Latgé, J. P., Hull, C. M., & Keller, N. P. (2010). Aspergillus fumigatus LaeA-mediated phagocytosis is associated with a decreased hydrophobin layer. *Infection and Immunity*, 78, 823–829.
- Dall, D. J. (1983a). A theory for the mechanism of polar filament extrusion in the microspora. *Journal of Theoretical Biology*, 105, 647–659.
- Dall, D. J. (1983b). A Theory for the Mechanism of Polar Filament Extrusion in the Microspora, 647–659.
- Delbac, F., Peuvel, I., Metenier, G., & Vivares, C. P. (2001). Microsporidian Invasion Apparatus : Identification of a Novel Polar Tube Protein and Evidence for Clustering of ptp1 and ptp2 Genes in Three Encephalitozoon Species Microsporidian Invasion Apparatus : Identification of a Novel Polar Tube Protein and Evidence. *Infection and Immunity*, 69, 1016–1024.
- Delbac, F., Peyret, P., Méténier, G., David, D., Danchin, A., & Vivarès, C. P. (1998). On proteins of the microsporidian invasive apparatus: Complete sequence of a polar tube protein of Encephalitozoon cuniculi. *Molecular Microbiology*, 29, 825–834.
- Dobbins, W. O., & Weinstein, W. M. (1985). Electron microscopy of the intestine and rectum in acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology*, 88, 738–749.
- Erickson, B. W., & Blanquet, R. S. (1969). The occurrence of chitin in the spore wall of Glugea weissenbergi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14, 358–364.
- Fasshauer, V., Gross, U., & Böhne, W. (2005). The Parasitophorous Vacuole Membrane of Encephalitozoon cuniculi Lacks Host Cell Membrane Proteins Immediately after Invasion. *Eukaryotic Cell*, 4, 221–224.
- Findley, A. M., Weidner, E. H., Carman, K. R., Xu, Z., & Godbar, J. S. (2005). Role of the

- posterior vacuole in *Spraguea lophii* (Microsporidia) spore hatching. *Folia Parasitologica*, 52, 111–117.
- Franzen, C., & Ller, A. M. (1999). Molecular Techniques for Detection, Species Differentiation, and Phylogenetic Analysis of Microsporidia, 12, 243–285.
- Freeman, M. A., & Sommerville, C. (2009). *Desmozoon lepeophtherii* n. gen., n. sp., (Microsporidia: Enterocytozoonidae) infecting the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Parasites and Vectors*, 2:58.
- Frixione, E., Ruiz, L., Santillán, M., de Vargas, L. V., Tejero, J. M., & Undeen, A. H. (1992). Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 22, 38–50.
- Goldberg, A. V., Molik, S., Tsaousis, A. D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., ... Embley, T. M. (2008). Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature*, 452, 624–629.
- Haag, K. L., James, T. Y., Pombert, J.-F., Larsson, R., Schaer, T. M. M., Refardt, D., & Ebert, D. (2014). Evolution of a morphological novelty occurred before genome compaction in a lineage of extreme parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi:10.1073/pnas.1410442111
- Han, B., Polonais, V., Sugi, T., Yakubu, R., Takvorian, P. M., Cali, A., ... Weiss, L. M. (2017). The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. *PLOS Pathogens*, 13, e1006341.
- Han, B., & Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5.
- Hauck, A. K. (1984). A mortality and associated tissue reactions of Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), caused by the microsporidian *Loma* sp. *Journal of Fish Diseases*, 7, 217–229.
- Hayman, J. R., Hayes, S. F., Amon, J., & Nash, T. E. (2001). Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Infection and Immunity*, 69, 7057–7066.
- Held, A. A. (1973). Encystment and germination of the parasitic chytrid *Rozella allomyces* on host hyphae. *Canadian Journal of Botany*, 51, 1825–1836.
- Huger, A. (1960). Electron microscope study on the cytology of a microsporidian spore by means of ultrathin sectioning. *J. Insect Pathol.* 2: 84-105.
- Ishihara, R. (2011). Stimuli causing extrusion of polar filaments of *Glugea fumiferanae* spores. *Canadian Journal of Microbiology*, 13, 1321–1332.

- Iwano, H., & Ishihara, R. (1989). Intracellular germination of spores of a *Nosema* sp. immediately after their formation in cultured cell. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54, 125–127.
- Jensen, H. M., & Welling, S. R. (1972). Development of the Polar Filament- Polaroplast Complex in a Microsporidian Parasite. *The Journal of Protozoology*, 19, 297–305.
- Katinka, M. D., Duprat, S., Cornillott, E., Méténler, G., Thomarat, F., Prensier, G., ... Weissenbach, J. (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414, 450–453.
- Keeling, P. J., & Fast, N. M. (2002). Microsporidia : Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56, 93–116.
- Kent, M. L. (2014). Microsporidia in fish. In *Microsporidia: Pathogens of opportunity* (pp. 493–520).
- Keohane, E. M., Orr, G. A., Zhang, H. S., Takvorian, P. M., Cali, A., Tanowitz, H. B., ... Weiss, L. M. (1998). The molecular characterization of the major polar tube protein gene from *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite of humans. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 94, 227–236.
- Keohane, E. M., & Weiss, L. M. (1998). Characterization and function of the microsporidian polar tube : a review. *Folia Parasitologica*, 45, 117–127.
- Kudo, R. R., & Daniels, E. W. (1955). An Electron Microscope Study of the Spore of a Microsporidian, *Thelohania californica* " *J. Biol. Chem. Methods in Enzymology J. J. Protozool*, 179, 435–53.
- Lee, S. C., & Heitman, J. (2014). Sex and the Microsporidia. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity* (pp. 231–243).
- Lenardon, M. D., Munro, C. A., & Gow, N. A. R. (2010). Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 416–423.
- Letcher, P. M., Longcore, J. E., Quandt, C. A., Leite, D. da S., James, T. Y., & Powell, M. J. (2017). Morphological, molecular, and ultrastructural characterization of *Rozella rhizoclosmatii*, a new species in Cryptomycota. *Fungal Biology*, 121, 1–10.
- Li, Y., Wu, Z., Pan, G., He, W., Zhang, R., Hu, J., & Zhou, Z. (2009). Identification of a novel spore wall protein (SWP26) from microsporidia *Nosema bombycis* q. *International Journal for Parasitology*, 39, 391–398.
- Li, Z., Pan, G., Li, T., Huang, W., Chen, J., Geng, L., ... Zhou, Z. (2012). SWP5, a spore wall protein, interacts with polar tube proteins in the parasitic microsporidian *nosema bombycis*. *Eukaryotic Cell*, 11, 229–237.

- Liu, T. P., & Davies, D. M. (1973). Ultrastructure of the frozen-etched polar filament in a microsporidan *Thelohania bracteata* (Strickland, 1913). *Zool.*, *51*, 217–219.
- Lom, J., & Vávra, J. (1963). The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. *Acta Protozool.*, 81–89.
- Malone, L. A. (1984). Factors controlling in vitro hatching of *Vairimorpha plodiae* (Microspora) spores and their infectivity to *Plodia interpunctella*, *Heliothis virescens*, and *Pieris brassicae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *44*, 192–197.
- Malone, L. A., Gatehouse, H. S., & Tregidga, E. L. (2001). Effects of time, temperature, and honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a parasite of the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, *77*, 258–268.
- Mansour, L., Ben Hassine, O. K., Vivares, C. P., & Cornillot, E. (2013). *Spraguea lophii* (Microsporidia) parasite of the teleost fish, *Lophius piscatorius* from Tunisian coasts: Evidence for an extensive chromosome length polymorphism. *Parasitology International*, *62*, 66–74.
- Manter, H. W., Canning, E. U., Curry, A., & Overstreet, R. M. (2002). Ultrastructure of *Tuzetia weidneri* sp. n. (Microsporidia: Tuzetiidae) in Skeletal Muscle of *Litopenaeus setiferus* and *Farfantepenaeus aztecus* (Crustacea: Decapoda) and New Data on *Perezia nelsoni* (Microsporidia: Pereziiidae) in *L. setiferus*. *Acta Protozoologica*, *41*, 63–77.
- Manter, H. W., Weidner, E., Overstreet, R. M., Tedeschi, B., Fuseler, J., Weidner, E., ... Fuseler, J. (1990). Cytokeratin and Desmoplakin Analogues within an Intracellular Parasite. *Biol. Bull.*, *179*, 237–242.
- Martín-Hernández, R., Aránzazu Meana, García-Palencia, P., Marín, P., Botías, C., Garrido-Bailón, E., ... Higes, M. (2009). Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*, 2554–2557.
- Netea MG, & Gow NA. (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest.*, *116*(6), 1642–50.
- Palenzuela, O., Redondo, M. J., Cali, A., Takvorian, P. M., Alonso-Naveiro, M., Alvarez-Pellitero, P., & Sitjà-Bobadilla, A. (2014). A new intranuclear microsporidium, *Enterospora nucleophila* n. sp., causing an emaciative syndrome in a piscine host (*Sparus aurata*), prompts the redescription of the family Enterocytozoonidae. *International Journal for Parasitology*, *44*, 189–203.
- Papahadjopoulos, D. (1968). Surface properties of acidic phospholipids: Interaction of monolayers and hydrated liquid crystals with uni- and bi-valent metal ions. *BBA* -

Biomembranes, 163, 240–254.

- Patil, C. S., & Geetha Bai, M. (1989). Studies on the susceptibility of silkworm races to pebrine spore, *Nosema bornbycis* Naegeli. *J. Appl. Ent*, 108, 421–423.
- Peuvel, I., Peyret, P., Méténier, G., Vivarès, C. P., & Delbac, F. (2002). The microsporidian polar tube: Evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 122, pp: 69-80.
- Powell, M. J. (1984). fine structure of the unwallled thallus of *rozella* polyphagi in its host pol yphagus euglenae. *Mycologia*, 76, 1039–1048.
- Prigneau, O., Achbarou, A., Bouladoux, N., & Mazier, D. (2000). Identification of Proteins in *Encephalitozoon intestinalis*, a Microsporidian Pathogen of Immunocompromised Humans: An Immunoblotting and Immunocytochemical Study. *Eukaryot. Microbiol.*, 47, 48–56.
- Quandt, C. A., Beaudet, D., Corsaro, D., Walochnik, J., Michel, R., Corradi, N., & James, T. Y. (2017). The genome of an intranuclear parasite, *Paramicrosporidium saccamoebae*, reveals alternative adaptations to obligate intracellular parasitism. *eLife*, 6:29594. doi:10.7554/eLife.29594
- Reinke, A. W., Balla, K. M., Bennett, E. J., & Troemel, E. R. (2017). Identification of microsporidia host-exposed proteins reveals a repertoire of rapidly evolving proteins. *Nature Communications*, 8. doi:10.1038/ncomms14023
- Rojas, E., & Tobias, J. M. (1965). Membrane model: Association of inorganic cations with phospholipid monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 45163, 394–404.
- Rönnebäumer, K., Gross, U., & Böhne, W. (2008). The nascent parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* is formed by host cell lipids and contains pores which allow nutrient uptake. *Eukaryotic Cell*, 7, 1001–1008.
- Southern, T. R., Jolly, C. E., Lester, M. E., & Hayman, J. R. (2007). EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro. *Eukaryotic Cell*, 6, 1354–1362.
- Sprague, V., & Vernick, H. S. (1971). The Ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporida, Nosematidae) and its Taxonomic Significance. *Protozool.* , 18, 560–569.
- Sprague, V., & Vernick, S. H. (1969). Light and Electron Microscope Observations on *Nosema nelsoni* Sprague, 1950 (Microsporida, Nosematidae) with Particular Reference to its Golgi Complex. *Protozool.* , 16, 264–271.
- Takvorian, P. M., Buttle, K. F., Mankus, D., Mannella, C. A., Weiss, L. M., & Cali, A. (2013). The multilayered interlaced network (MIN) in the sporoplasm of the

- microsporidium annaliia algerae is derived from golgi. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60, 166–178.
- Tobias, J. M. (1948). Potassium, sodium and water interchange in irritable tissues and haemolymph of an omnivorous insect, periplaneta americana. *J Cell Comp. Physiol.*, 2, 125–142.
- Tokarev, Y. S., Voronin, V. N., Seliverstova, E. V., Dolgikh, V. V., Pavlova, O. A., Ignatieva, A. N., & Issi, I. V. (2010). Ultrastructure and molecular phylogeny of Anisofilariata chironomi g.n. sp.n. (Microsporidia: Terresporidia) from Chironomus plumosus L. (Diptera: Chironomidae). *Parasitol. Res.*, 107, 39–46.
- Tsaousis, A. D., Kunji, E. R. S., Goldberg, A. V., Lucocq, J. M., Hirt, R. P., & Embley, T. M. (2008). A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of Encephalitozoon cuniculi. *Nature*, 453, 553–556.
- Undee, A. H., & Meer, R. K. Vander. (1994). Conversion of Intraspore Trehalose into Reducing Sugars During Germination of Nosema algerae (Protista: Microspora) Spores: A Quantitative Study. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41, 129–132.
- Undeen. (1990). A Proposed Mechanism for the Germination of Microsporidian Spores. *J. Theor. Biol.*, 142, 223–235.
- Undeen, A. H. (1983). The Germination of Vavraia culicis Spores. *The Journal of Protozoology*, 30, 274–277.
- Undeen, A. H., & Avery, S. W. (1988). Effect of anions on the germination of Nosema algerae (Microspora: Nosematidae) spores. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52, 84–89.
- Undeen, A. H., & Avery, S. W. (1988). Spectrophotometric measurement of Nosema algerae (Microspora: Nosematidae) spore germination rate. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52, 253–258.
- Undeen, A. H., ElGazzar, L. M., Vander Meer, R. K., & Narang, S. (1987). Trehalose levels and trehalase activity in germinated and ungerminated spores of Nosema algerae (Microspora: Nosematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 50, 230–237.
- Undeen, A. H., & Frixione, E. (1990). The Role of Osmotic Pressure in the Germination. *Protozool.*, 37, 561–567.
- Undeen, A. H., & Meer, R. K. Vander. (1999). Microsporidian Intraspore Sugars and Their Role in Germination. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73, 294–302.
- Vandermeer, J. W., & Gochnauer, T. A. (1971). Trehalase activity associated with spores of Nosema apis. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17, 38–41.

- Vávra, J., & Larsson, J. I. R. (2014). Structure of Microsporidia. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition*, 1–70.
- Vávra, J., & Lukeš, J. (2013). Microsporidia and “The Art of Living Together.” *Advances in Parasitology*, 82, 253–298.
- Vinckier, D., Porchet, E., Vivier, E., Vávra, J., & Torpier, G. (1993). A freeze-fracture study of microsporidia (Protozoa: Microspora): II. The extrusion apparatus: Polar filament, polaroplast, posterior vacuole. *European Journal of Protistology*, 29, 370–380.
- Vossbrinck, C. R., Maddox, J. V., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B. A., & Woese, C. R. (1987). Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*, 326, 411–414.
- Weidner, E. (1970). Ultrastructural Study of Microsporidian Development. *Z. Zellforsch*, 105, 33–54.
- Weidner, E. (1972). Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Z. Parasitenk.*, 40, 227–242.
- Weidner, E. (1976). The microsporidian spore invasion tube: The ultrastructure, isolation, and characterization of the protein comprising the tube. *Journal of Cell Biology*, 71, 23–34.
- Weidner, E., & Byrd, W. (1982). The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge. *Journal of Cell Biology*, 93, 970–975.
- Weidner, E., Byrd, W., Scarborough, A. N. N., Pleshinger, J., & Sibley, D. (1984). Microsporidian Spore Discharge and the Transfer of Polaroplast Organelle Membrane into Plasma Membrane. *Protozool.*, 31, 195–198.
- Weidner, E., & Findley, A. (2003). Catalase in microsporidian spores before and during discharge. *The Biological Bulletin*, 205, 236–237.
- Weidner, E., & Halonen, S. K. (1993). Microsporidian Spore Envelope Keratins Phosphorylate and Disassemble During Spore Activation. *J. Euk. Microbiol*, 40, 783–788.
- Weiss, L. M. (2001). Microsporidia: Emerging pathogenic protists. *Acta Tropica*, 78, 89–102.
- Williams, B. A. P., Hirt, R. P., Lucocq, J. M., & Embley, T. M. (2002). A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature*, 418, 865–869.
- Xu, Y., Takvorian, P. M., Cali, A., Orr, G., & Weiss, L. M. (2004a). Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a microsporidian parasite that infects humans. *Infection and Immunity*, 72, 6341–6350.
- Xu, Y., Takvorian, P. M., Cali, A., Orr, G., & Weiss, L. M. (2004b). Glycosylation of the Major Polar Tube Protein of *Encephalitozoon hellem*, a Microsporidian Parasite That

- Infects Humans. *Infection and Immunity*, 72, 6341–6350.
- Xu, Y., & Weiss, L. M. (2005). The microsporidian polar tube : A highly specialised invasion organelle. *International Journal for Parasitology*, 35, 941–953.
- Yang, D., & Li, T. (2016). Interaction between SWP9 and PTPs of the microsporidian *Nosema bombycis* and SWP9 as a scaffolding protein contributes to the polar tube tethering to spore wall. *Infection and Immunity*, 85, e00872-16.
- Yang, D., Pan, G., Dang, X., Shi, Y., Li, C., Peng, P., ... Zhou, Z. (2015). Interaction and assembly of two novel proteins in the spore wall of the microsporidian species *Nosema bombycis* and their roles in adherence to and infection of host cells. *Infection and Immunity*, 83, 1715–1731.
- Yang, D., Pan, L., Chen, Z., Du, H., Luo, B., Luo, J., & Pan, G. (2018). The roles of microsporidia spore wall proteins in the spore wall formation and polar tube anchorage to spore wall during development and infection processes. *Experimental Parasitology*, *Accepted Manuscript*.